



TITLE:

マウス脾細胞のCa²⁺依存性システインプロテアーゼ(カルパイン)とその内因性インヒビター(カルパスタチン)の動態に関する研究

AUTHOR(S):

中山, 昇; 稲本, 俊

CITATION:

中山, 昇 ...[et al]. マウス脾細胞のCa²⁺依存性システインプロテアーゼ(カルパイン)とその内因性インヒビター(カルパスタチン)の動態に関する研究. 日本外科宝函 1984, 53(1): 213-220

ISSUE DATE:

1984-01-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208742>

RIGHT:

マウス脾細胞の Ca^{2+} 依存性システインプロテアーゼ
(カルパイン)とその内因性インヒビター(カル
パスタチン)の動態に関する研究

京都大学医学部外科学教室第2講座(指導:日笠頼則教授)

中山 昇, 稲本 俊

〔原稿受付:昭和58年10月14日〕

Ca^{2+} -dependent Protease(Calpain) and Its Endogenous Inhibitor
(Calpastatin) in Murine Spleen Cells: Quantitative Change
at Lymphoproliferative Response to Mitogens

NOBORU NAKAYAMA and TAKASHI INAMOTO

2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

Ca^{2+} -dependent protease (calpain) and its endogenous inhibitor (calpastatin) were present in murine spleen cells. Their characteristics were much the same as other tissues and cells. The ratio of activities of calpain I which required $40\mu\text{M}$ Ca^{2+} for 50% activation and calpain II which required $350\mu\text{M}$ Ca^{2+} for 50% activation was 3: 1. The total activity of calpain (calpain I+calpain II) was slightly less than that of calpastatin.

Suppression of lymphoproliferative responses of the spleen cells to concanavalin A (Con A) and Lipopolysaccharide (LPS) by chelating Ca^{2+} with EGTA suggested the necessity of Ca^{2+} for these responses. The activity of calpain I in the spleen cells increased twofold in initial 24 hours and remained at the lymphoproliferative response to Con A, whereas it increased twofold in 48 hours and decreased thereafter at the response to LPS. These changes of the proteolytic activity ran parallel to the volume of DNA. Increase of the activity of calpastatin continued upto 48 hours at the responses both to Con A and LPS, which resembled to the changes of the volume of protein and RNA. The ratio of activities of calpain I, calpain II and calpastatin at 72 hours culture with Con A was similar to that of the nylon wool adherent fraction of the spleen cells before culture. In contrast, the ratio of them at 72 hours culture with LPS resembled to that of nylon wool nonadherent fraction. These results suggest that calpain and calpastatin in spleen cells may actively increase at lymphoproliferative responses to mitogens and participate in the responses.

Key words: Calpain, Calpastatin, Concanavalin A, Lipopolysaccharide. Lymphoproliferative response

索引語: カルパイン, カルパスタチン, コンカナバリンA, リポポリサッカライド

Present address: The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine,
Kyoto University, 54 Kawara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

はじめに

細胞内における Ca^{2+} の役割については古くから筋肉収縮などに関連してその重要性が認められており、最近では、カルモデュリンやC-キナーゼなどに関連して、 Ca^{2+} の生体内における可逆的な変化や制御系における役割と、それに関与する種々の酵素が注目されている。そのなかで、1964年に Guroff¹⁷⁾ によってラットの脳で発見された Ca^{2+} により活性化される中性プロテアーゼはその後の研究により、種々の動物の多くの組織や細胞内にその特異的なインヒビターとともに存在することが明らかとなり、1981年に村地により提唱され¹⁸⁾、国際生化学連合命名委員会により“EC3, 4, 22, 17”と登録され、プロテアーゼはカルパインと命名された²⁰⁾。また、インヒビターはカルパスタチンと呼ばれている¹⁹⁾。そして、このカルパインは骨格筋や心筋の筋肉蛋白質の分解^{2, 10, 22, 26)}、細胞骨格線維の分解^{1, 6, 12, 25)}、ステロイドホルモン受容体の変性²¹⁾、phosphorylase kinase の不可逆的な活性化^{4, 6, 11)} などその生物学的活性は細胞の不可逆的な変化に関与していると考えられている¹⁷⁾。

一方、細胞の不可逆的な変化という点では細胞分裂は最も重要な現象であり、そのなかで、リンパ球の幼若化反応は、一旦細胞周期としては静止期に入ったものが mitogen や抗原の刺激により、再び分裂を開始するという特異なものである。特に、phytohemagglutinin (PHA) や concanavalin A (ConA) に対する反応では mitogen が細胞表面の receptor に結合するのに引続いて、 Ca^{2+} が細胞内に流入することが知られている⁵⁾。これらのことからリンパ球幼若化反応にカルパインやカルパスタチンが深く関与していることが想定された。そこで、マウス脾細胞を用いて、リンパ球中のカルパインとカルパスタチンの存在を証明するとともに、リンパ球幼若化反応応にともなうこれらの量的な変化を検討する目的で本研究を行なった。

実験材料および方法

1 マウス脾細胞の分離

12~15週令の C3H/He 雄マウス (塩野義製薬油日研究所より提供) を用い、実験開始まで通常の食餌を摂取させた。マウスを屠殺後直ちに脾臓を採取し、細切し、#100 ステンレスメッシュを通して細胞浮遊液とした。赤血球を 0.83% NH_4Cl -Tris-HCl (pH 7.6) の処理により除き、Hanks' Balanced Salt Solu-

tion (HBSS, 和光純薬) で3回洗滌した。

2. マウス脾細胞のカルパインとカルパスタチンのゲル濾過による分離および活性の測定

得られた脾細胞を生理食塩水にて洗滌後、20 mM Tris-HCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM EGTA, pH 7.5 の buffer (以下 buffer) に浮遊した。この buffer 浮遊脾細胞を氷冷下に10秒間超音波破碎し、 $105000 \times g$ にて90分間超遠心を行なった。この超音波処理ではカルパインとカルパスタチンの活性に変化はみられなかった。得られた可溶性分画を Ultrogel AcA 34 (LKB) のカラムにて、4°C でゲル濾過を行なった。

カルパインの活性は0.5%カゼインを基質とし、pH 7.5 の 50 mM Imidazole-HCl buffer 中にて、10 mM のシステイン存在下に測定した¹⁶⁾。カルパイン I 型は 0.1 mM CaCl_2 、カルパイン II 型は 3 mM CaCl_2 にて反応を開始させ、30°C、30分間反応後、7.5% Trichloroacetic acid (TCA) 溶液を加えて反応を停止した。この酸可溶性分画の蛋白量を lowry 法¹³⁾ の Ross & Schatz 変法²³⁾ により 750 nm で比色定量した。

一方、カルパスタチン活性はラットの肝臓での方法¹⁶⁾ に従って得られたマウス肝臓のカルパイン II 型の酵素活性の阻害をもってその活性とした。カルパインの活性単位は 30°C、30分間の反応で 750 nm の吸収が 1.0 増加する酵素量をもって 1 Unit と定義した。カルパスタチンの活性単位は同条件下でカルパイン 1 Unit を阻害する量を 1 Unit とした。

3. リンパ球幼若化反応

1. で得られた脾細胞を10%牛胎児血清 (FCS, Micro Biomedics) と 1% HEPES を加えた RPMI 1640 に細胞濃度が $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように浮遊した。このマウス脾細胞を Concanavalin A (ConA, 和光純薬) 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは Lipopolysaccharide, E. coli (LPS, Difco) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加して 37°C、5% CO_2 の条件下で培養した。

リンパ球幼若化反応の程度は ^3H -Thymidine の取込み量により判定した⁹⁾、すなわち、上記の脾細胞を Microtestplate II (Nunc) で培養し、48時間後に 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ の ^3H -Thymidine (New England Nuclear) を加え、さらに18時間培養し、cell harvester (Labo Mash, Labo Science) にて細胞を回収し、その取込み量を液体シンチレーションカウンター (ISOCAP 300, Nuclear Chicago) にて測定した。また、 Ca^{2+} 濃度のリンパ球幼若化反応に及ぼす影響を検討するため、種

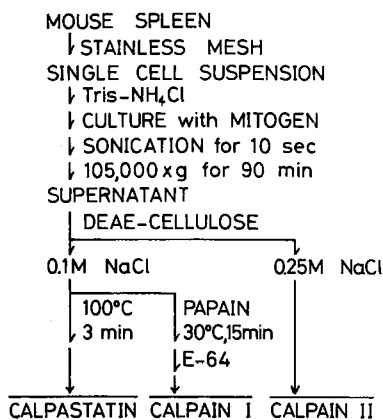


Fig. 1. Separation of Calpain I, II and Calpastatin

々の濃度の CaCl_2 や EGTA を培養開始時に添加した。測定は triplicate にておこない幼若化反応の程度は下記の式により計算した。

$$\Delta \text{cpm} = \text{mitogen 添加培養時の cpm} - \text{mitogen 非添加培養時の cpm}$$

4. 培養脾細胞のカルパインとカルパスタチンの分離および測定

培養脾細胞を経時的に回収し、HBSS で3回洗滌後、2.と同様にして超音波破碎を行ない、そのDNA量を Dische 法³⁾にて、RNA量を Schneider 法²⁴⁾にてそれぞれ測定した。次いで、超遠心後の可溶性分画を得、その蛋白量を Lowry 法¹³⁾にて測定した。この可溶性分画を DEAE-Cellulose (Whatman) クロマトグラフィーにかけ、0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.25 M NaCl で段階的に溶出させた¹⁵⁾。この 0.1 M NaCl 分画には

カルパイン I 型とカルパスタチンとが回収され、0.25 M NaCl 分画にはカルパイン II 型が回収された (Fig. 1)。0.1 M NaCl 分画に混在するカルパイン I 型とカルパスタチンを分離測定するために、100°C、3分間の熱処理にてカルパイン I 型を失活させカルパスタチンの活性を測定した。一方、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ パパインで30°C、15分間処理しカルパスタチンを完全に失活させ、さらに、パパインの活性を 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の E-64で阻害してカルパイン I 型の活性を測定した。カルパイン I 型はこの濃度のパパイン処理では失活せず、また、この濃度の E-64 ではほとんど阻害を受けない。(田中一仁、未発表)

5. ナイロンウールカラムによるマウス脾細胞の分離

1. で得られた脾細胞を10% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊し、Julius の方法¹¹⁾に従ってナイロンウールカラムを通して、ナイロンウール非付着分画と付着分画に分離した。そして、それぞれの分画のカルパイン I 型、II 型とカルパスタチンを4.の方法で活性を測定した。

結 果

1 マウス脾細胞におけるカルパインおよびカルパスタチン

マウス脾細胞の可溶性分画を Ultrogel AcA 34にてゲル濾過し、カルパインとカルパスタチンに分離した結果を Fig. 2 に示す。この部分精製よりマウス脾細胞にはカルパイン I 型、II 型およびカルパスタチンの3者ともが存在していることがわかった。ゲル濾過による分子量推定ではカルパスタチンは28万前後の分子量の位置に溶出した。カルパイン II 型は分子量約9万

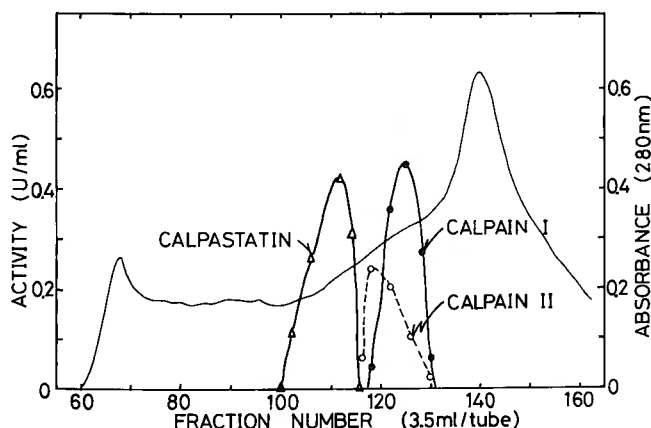


Fig. 2. Separation of Calpain I, II and Calpastatin on Ultrogel AcA 34 (mouse spleen cells)

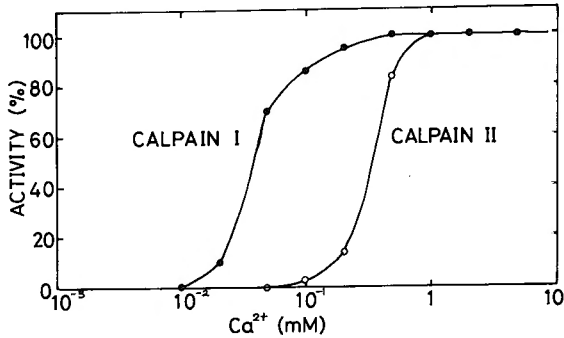


Fig. 3. Difference in Ca²⁺ Requirement of Calpain I and II

の位置に溶出し、I型は約8万の位置に溶出した。カルパスタチンの阻害活性の総単位はカルパインのI型とII型を加えた活性総単位よりも少し大であった。また、カルパインI型とII型とを比較してみると、I型の方がII型よりも約3倍多く存在していた。

次にマウス脾細胞の可溶性分画を DEAE-Cellulose クロマトグラフィーと Ultrogel AcA 34 ゲル濾過によって部分精製したカルパインI型とII型の性質を比較したものが Fig. 3 と Table 1 である。カルパインI型とII型共に Ca²⁺ がないと全く酵素活性がみられず、Ca²⁺ 絶対要求性を示した。そして、カルパインI型は 20 μM Ca²⁺ では全活性の10%しか活性化されないが、200 μM ではほぼ全活性を示したのに対し、カルパインII型は 200 μM Ca²⁺ では10%しか活性化されず、全活性を示すには 1 mM 以上の Ca²⁺ を必要とした。このようにカルパインI型は低 Ca²⁺ 要求性であり、II型は高 Ca²⁺ 要求性であった。また、カルパインは熱に弱く、100°C、3分間の処理で完全に失活し 58°C、10分間の処理ではカルパインI型は20%の失活がみら

れただけなのに対し、カルパインII型は100%失活した。さらに、カルパインI型は Ca²⁺ 存在下で、30°C、10分間の処理では自己消化がみられなかったが、カルパインII型は50%自己消化がみられた。

2. リンパ球幼若化反応に及ぼす Ca²⁺ の影響

Fig. 4 は培養開始時に EGTA を添加して培養液中の Ca²⁺ 濃度を下げたときのリンパ球幼若化反応の程度をみたものである。培養液には約 0.75mM の Ca²⁺ が含まれており、EGTA を加えても培養液中の Ca²⁺ が 0.25 mM までは ConA と LPS のいずれに対する反応とも非添加時と同程度にみられた。しかし、EGTA が 1 mM 添加されると両者とも完全に抑制された。

EGTA を加えた上にさらに CaCl₂ を添加して培養中の Ca²⁺ を 0.25 mM 以上に高めると ConA と LPS に対する反応はともに回復した。LPS に対する反応は Ca²⁺ が 0.25 mM になると EGTA 非添加時と同程度までに回復し、さらに Ca²⁺ が増加すると逆に反応は低下した。ConA に対する反応は Ca²⁺ が

Table 1. The Properties of Calpain I and II

PROPERTIES	CALPAIN I	CALPAIN II
MOLECULAR WEIGHT (Ultrogel AcA 34)	80,000	90,000
FOR 50% ACTIVATION		
Ca ²⁺	40 μM	350 μM
CYSTEINE	1.5 mM	2.0 mM
INACTIVATION		
HEAT (58°C, 10min)	20%	100%
AUTOLYSIS (30°C, pH 7.5, Ca ²⁺ 0.1 mM for CALP. I, 3 mM for CALP. II)	0% after 10 min	50% after 10 min

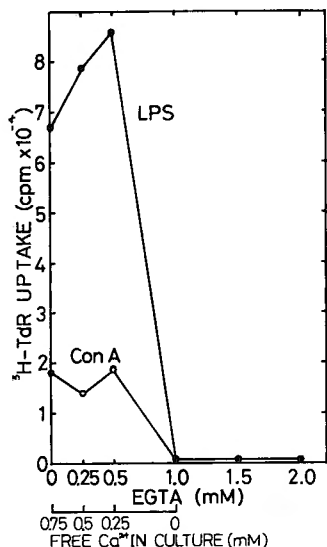


Fig. 4. Suppression of EGTA on mitogen Response

1 mM になって始めて EGTA 非添加時と同程度まで回復し、やはり 2.25 mM といった高濃度では反応が低下した (Fig. 5a, 5b, 5c).

3. ConA に対する幼若化反応にともなう脾細胞のカルパインとカルバスタチンの変動

細胞数あたりのカルパインとカルバスタチンの活性を経時的にみると、カルパイン I 型は培養後24時間で培養前値の約2倍に増加しその後は増減を示さなかったが、カルパイン II 型とカルバスタチンは培養72時間まで漸増した (Fig. 6a).

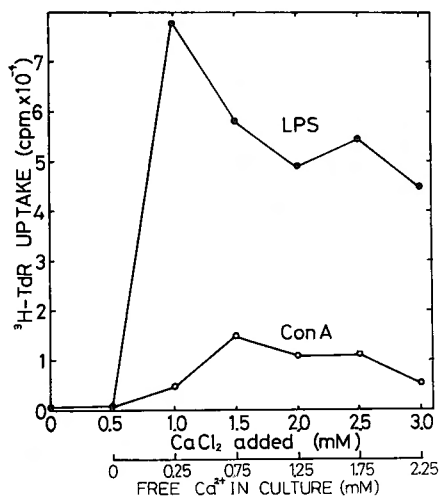


Fig. 5-b. Mitogen Response with 1.5mM EGTA

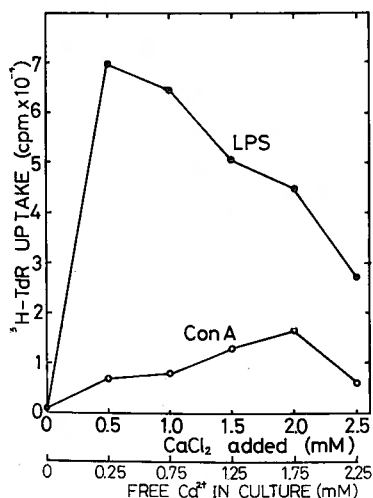


Fig. 5-a. Mitogen Response with 1.0mM EGTA

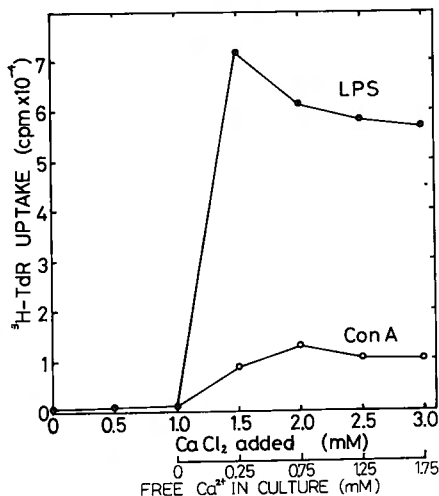


Fig. 5-c. Mitogen Response with 2.0mM EGTA

この変化に対応して、細胞数あたりの蛋白量、DNA 量と RNA 量の変動を測定すると、DNA は培養24時間まで増加し、72時間では低下がみられた。これに対して、RNA と蛋白質は48時間まで増加を続け、72時間では同じく低下がみられた (Fig. 6b).

4. LPS に対する幼若化反応にともなう脾細胞のカルパインとカルバスタチンの変動

LPS に対する場合は ConA に対する場合と異なりカルパイン I 型は培養後48時間まで増加し、72時間ではかなり低下し、カルパイン II 型は培養24時間までに約3倍にまで増加し、72時間では培養前値まで低下し

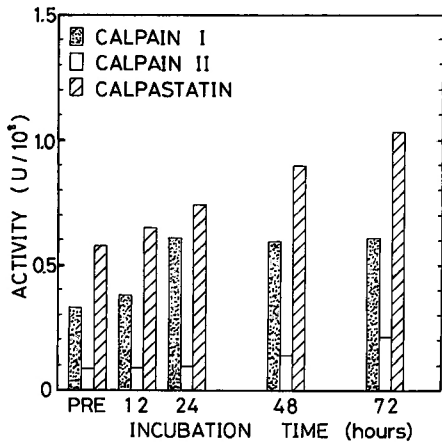


Fig. 6-a. Effects of Con A on Calpain I, II and Calpastatin

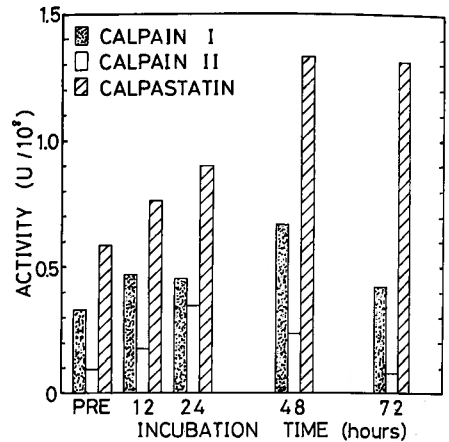


Fig. 7-a. Effects of LPS on Calpain I, II and Calpastatin

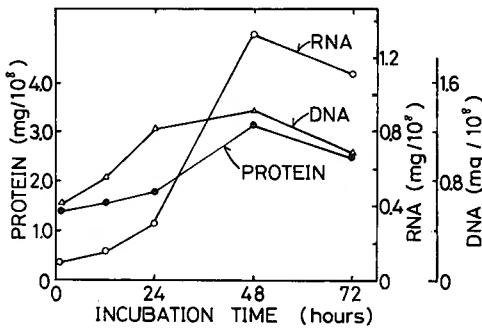


Fig. 6-b. Changes of the Amount of DNA, RNA and Protein after the Incubation with Con A

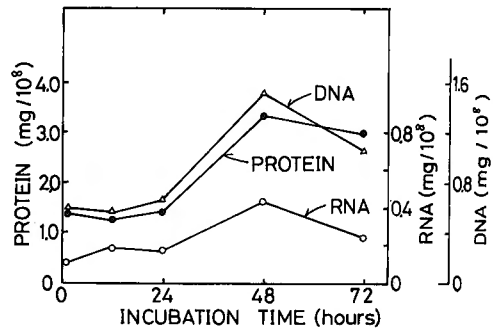


Fig. 7-b. Changes of the Amount of DNA, RNA and Protein after the Incubation with LPS

た。これに対してカルパスチタンは48時間まで増加し、72時間でも高値を維持した (Fig. 7a)。しかし、DNA量、RNA量と蛋白量のいずれも48時間までの間に増加し、72時間では減少していた (Fig. 7b)。カルパイン I 型、II 型とカルパスチタンの活性比は培養前がほぼ 3:1:6 であるが、ConA に対する反応の72時間目では 3:1:5、LPS に対する反応では 4:1:13 であった。

5. ナイロンウール非付着分画と付着分画におけるカルパインとカルパスチタン

ナイロンウール非付着分画のカルパイン I 型、II 型とカルパスチタンの活性比は 3:1:10で、付着分画の比は 3:1.5:5であった (Fig. 8)。また、細胞当りの活性を比較すると、ナイロンウール非付着分画のカルパイン I 型と II 型は付着分画の約 1/2 とであったが、カルパスチタンの活性は両分画でほぼ同じであった。

考 察

細胞はその恒常性を維持するためにリン酸化、脱リン酸化に代表される可逆的な代謝反応を有しており、一方、その本質的な変化には不可逆的な代謝反応が関与していると考えられている。この不可逆的な代謝反応には細胞内プロテアーゼの関与が想定されているが、Ca²⁺ 依存性システインプロテアーゼであるカルパインとその内因性インヒビターが非リソゾーム分画に共存することは^{15,17)}、これらの両因子の生物学的意義を考察する上で興味深い事実である。

カルパインとカルパスチタンが動物の種々の組織や細胞に存在することは既に報告されており¹⁸⁾、個々の組織や細胞におけるそれらの活性や活性化は異なっている。例えば、ラットの腎臓ではカルパスチタンの活性はみられず、赤血球ではカルパイン II 型の活性のみ

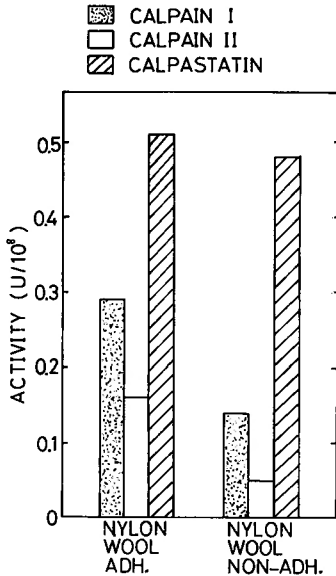


Fig. 8. Activities of Calpain I, II & Calpastatin of Mouse Spleen Cells

られない¹⁰⁾。今回行なったマウス脾細胞ではカルパイン I 型、II 型とカルパスタチンの三者とも存在し、その活性化はほぼ 3 : 1 : 6 であり、カルパスタチンが優位であった (Fig. 2)。これはマウス肝臓での 1 : 5 : 4¹⁰⁾ と全く異なった活性化を示した。しかし、それらのゲル濾過による推定分子量や Ca^{2+} 要求性などの性質は他の細胞由来のものと差はなかった (Fig. 2, 3, Table 1)。

細胞質内の Ca^{2+} 濃度は非常に低く細胞質に存在するカルパインは通常の状態では低 Ca^{2+} 要求性の I 型でさえも活性を示すことができないと考えられている。ConA に対するリンパ球幼若化反応においては反応の初期に Ca^{2+} が細胞内に流入することが知られており⁹⁾、今回の実験のマウス脾細胞の場合も EGTA を Ca^{2+} 濃度以上に培養液に加えると反応は完全に抑制された (Fig. 4)。LPS に対する反応の場合は Ca^{2+} が細胞内へ流入するか否かは議論のあるところであるが、EGTA の添加により反応は同じく抑制された (Fig. 4)。さらに、 CaCl_2 を加えて培養液中の Ca^{2+} 濃度を戻すと反応が回復した (Fig. 5a, 5b, 5c)。これらのことはリンパ球幼若化反応に Ca^{2+} が必要なことを示している。特に、ConA に対する反応においては Ca^{2+} の流入により細胞内の Ca^{2+} 濃度は全てが細胞質内にとどまるとすると 0.97 mM に増加する⁹⁾。この濃度はカルパインが十分活性化されるものであり、カルパインやカルパスタチンがこの反応に関与している

可能性が考えられた。

このリンパ球幼若化反応にともなうカルパインとカルパスタチンの活性の変動をみると、カルパイン I 型は ConA に対する反応では培養後 24 時間で既に 2 倍に活性が増加するのに対して、LPS に対する反応では 48 時間目に 2 倍に増加した。この活性の変動は DNA 量の変化と並行した。カルパイン II 型は ConA に対する反応では 48 時間から活性の増加がみられるのに対して、LPS に対する反応では 24 時間目で既に 3 倍に増加し、以後漸減した。これに対して、カルパスタチンは培養 48 時間まで増加し、蛋白量や RNA 量の変動と並行した (Fig. 6a, 7b, 7a, 7b)。このカルパインとカルパスタチンの活性の変化は ConA が T cell mitogen であり、LPS が B cell mitogen であるところから、単に反応後の population の変化によるものの可能性がある。しかし、ConA を添加して培養した 72 時間目のカルパインとカルパスタチンの活性化は培養前の脾細胞のナイロンウール付着分画のものに似た比を示し、LPS に対する反応ではナイロンウール非付着分画に近い活性化を示したことによりこの可能性は否定的であった (Fig. 6a, 7a, 8)。これらの結果からリンパ球幼若化反応においてカルパインとカルパスタチンがなんらかの役割を果していることが示唆された。

ま と め

マウス脾細胞中には Ca^{2+} 依存性システインプロテアーゼのカルパインとその内因性インヒビターのカルパスタチンが存在し、低 Ca^{2+} 要求性の I 型、高 Ca^{2+} 要求性の II 型とカルパスタチンの活性の相対比は 3 : 1 : 6 でカルパスタチン優位であった。これらのプロテアーゼとインヒビターの性質は他の動物の組織や細胞のそれと変わらなかった。マウス脾細胞を ConA で刺激して幼若化反応をおこせると、細胞当りのカルパイン I 型の活性は培養 24 時間で約 2 倍となり、その後増減しなかったが、LPS に対する反応ではカルパイン I 型は 48 時間まで約 2 倍に増加し、その後減少した。この変化は細胞当りの DNA 量の変化と並行した。また、カルパスタチンはいずれに対する反応の際にも 48 時間まで漸増し、蛋白量や、RNA 量の変化と並行した。さらに、ConA に対する反応の 72 時間目のカルパインとカルパスタチンの活性比は培養前のナイロンウール付着分画のそれに近く、LPS に対する反応ではナイロンウール非付着分画のそれに似ており、これらの変動が population の変化によるものではない

と考えられた。これらの結果と幼若化反応にともなう Ca^{2+} がリンパ球内に流入することを考え合せると、リンパ球幼若化反応にカルパインとカルパスタチンが関与している可能性が強く示唆された。

御指導と御校閲を戴いた日笠頼則教授と病態学研究室村地孝教授、田中一仁氏に感謝致します。また、本研究は外科第17研究室、病態学研究室、並びに、放射性同位元素総合センターで行なわれたことを付記して感謝します。

文 献

- 1) Davies PJA, Wallach D, et al: Filamin-actin interaction. Dissociation of binding from gelation by Ca^{2+} -activated proteolysis. *J Biol Chem* **235**: 4036-4042, 1978.
- 2) Dayton WR, Goli DE, et al: A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* **15**: 2150-2158, 1976.
- 3) Dische VZ: Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. *Mikrochemie* **8**: 4-32, 1930.
- 4) Drummond GI, Duncan L: On the mechanism of activation of b kinase by calcium. *J Biol Chem* **243**: 5532-5538, 1968.
- 5) Freedman MH: Early biochemical events in lymphocyte activation. I. Investigation on the nature and significance of early calcium influxes observed in mitogen-induced T- and B lymphocytes. *Cell. Immunol.*, **44**: 290-313, 1979.
- 6) Gilbert DS, Newby BJ: Neurofilament disguise, destruction and disipline. *Nature*, **256**: 586-589, 1975.
- 7) Guroff G: A neutral calcium-activated protease from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* **239**: 149-155, 1964.
- 8) Huston RB, Krebs EG: Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca^{2+} . II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochemistry*, **7**: 2116-2122, 1968.
- 9) Inamoto T, Kan N, et al: Different immunosuppression on specific anti-tumor and non-specific cellular immunity of tumor bearing mice following tumor growth. *Arch. Jpn. Chir.*, **52**: 1-206, 1983.
- 10) Ishiura S, Murofushi, H, et al: Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization. *J. Biochem.*, **48**: 2551-230, 1978.
- 11) Julius MH, Simpson E, et al: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**: 645-649, 1973.
- 12) Klein I, Lehotay, D. et al: Characterization of a calcium-activated protease that hydrolysed a microtubule-associated protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **208**: 520-527, 1981.
- 13) Lowry OH, Rosebrough NJ, et al: Protein measurement with the Folin phenolreagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
- 14) Meyer WSI, Fischer EH, et al: Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca^{2+} . *Biochemistry*, **3**: 1033-1039, 1964.
- 15) Murachi T, Tanaka K, et al: Intracellular Ca^{2+} -dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv. Enzyme Regul.*, **19**: 407-424, 1981.
- 16) Murachi T, Hatanaka M, et al: A quantitative and distribution study on calpain and calpastatin in rat tissues and cells. *Biochem. Intern.*, **2**: 651-656, 1981.
- 17) Murachi T: Calpain and calpastatin. *Trends Biochem. Sci.*, **8**: 167-169, 1983.
- 18) 中山 昇, 田中一仁, 他: マウス肝とラット肝におけるカルパイン及びカルパスタチンの比較. *生化学* **53**: 776, 1981.
- 19) Nishiura, T, Tanaka K, et al: The occurrence of an inhibitor of Ca^{2+} -dependent neutral protease in the rat. *J Biochem. (Tokyo)*, **84**: 1657-1659, 1978.
- 20) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry: Enzyme nomenclature. *Eur. J. Biochem.*, **116**: 423-435, 1981.
- 21) Puca GA, Nola E, et al: Estrogen binding proteins of calf uterus. Molecular and functional characterization of the receptor transforming factor: a Ca^{2+} -activated protease. *J Biol chem* **252**: 1358-1336, 1977.
- 22) Reddy MK, Etlinger, JD, et al: Removal of Z-lines and α -actinin from isolated myofibrils by a calcium-activated neutral protease. *J Biol Chem* **250**: 4278-4284, 1975.
- 23) Ross, E, Schatz G: Assay of the presence of high concentration of sulfhydryl compounds. *Ann. Biochem.*, **54**: 304-306, 1973.
- 24) Schneider, WC: Phosphorus component in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J Biol Chem* **161**: 293-303, 1945.
- 25) Truglia JA, Stracher A: Purification and characterization of a calcium dependent sulfhydryl protease from human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 814-822, 1981.
- 26) Waxman L, Krebs, EG: Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem* **253**: 5888-5891, 1978.